

SCHLUSSBERICHT

Molecular Diagnosis of Neurodegenerative Diseases in the Eye (MINDE)

FKZ 13N10638

med
ways.



Schlussbericht

zum Teilvorhaben

Ophthalmologie
13N10638, Klinikum FSU Jena, Augenklinik

des Verbundprojektes

Molecular Diagnosis of Neurodegenerative Diseases in the Eye (MINDE)

Der vorliegende Bericht ist zur Veröffentlichung bestimmt. Ggf. vertrauliche Ergebnisse/Informationen werden im Erfolgskontrollbericht dargestellt.

Laufzeit des Verbundprojekts: 01.10.2009 - 30.09.2012

1 Zusammenfassung

Ziel des Teilprojektes war die Untersuchung der Eigenfluoreszenz von okulären Geweben. Diese war hinsichtlich ihres Emissionsspektrums und Fluoreszenzlebensdauern zu charakterisieren und daraus Kriterien für die Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften der Sonden für Amyloid β bzw. τ -Protein zu bestimmen. Es war zu untersuchen ob sich die Fluoreszenz der Sonden von der Gewebefluoreszenz durch spektrale Entmischung trennen lässt. In einer klinischen Studie war nach für Alzheimer Demenz charakteristischen Symptomen am Auge einschließlich der Konzentration von Low-density Lipoprotein Rezeptor 1 im Tränenfilm gesucht worden. Über etablierte ophthalmologische Untersuchungsmethoden hinaus ist dabei die abbildende Fluoreszenzlebensdauerermessung (FLIO) eingesetzt worden. Ferner war die Eignung des vom Projektpartner Carl Zeiss AG erstellten und auf der neuartigen MEMS-scanner Technologie basierenden Demonstrators für die Beobachtung und Messung von der Eigenfluoreszenz vom menschlichen Augenhintergrund zu validieren.

Eine Eigenfluoreszenz des Augenhintergrundes sowie der Hornhaut und der Linse konnte im gesamten Spektralbereich zwischen 500 und 700 nm (Anregung 488 nm) mit Emissionsmaxima bei 530 und um 600 nm nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzlebensdauern waren für einzelne Gewebe sehr unterschiedlich und bewegten sich zwischen 100 ps und 2-3 ns. Trotz der breiten Emissionscharakteristik endogener Fluorophore konnte die Fluoreszenz der Farbstoffe Bsc4510 und DY-630 durch spektrale Entmischung separiert werden. Herkömmliche augenärztliche Untersuchungsmethoden lieferten keine Anhaltspunkte für Symptome oder Biomarker der Alzheimer Demenz. Dagegen wurde ein Zusammenhang des Beitrages (Amplitude und relativer Anteil an der Gesamtfluoreszenz) der Fluoreszenzkomponente mit einer Lebensdauer um 435 ps bei Wellenlängen >570 nm mit dem Schweregrad der Demenz (MMST-score und Konzentration von τ -Protein im Liquor) gefunden. Mit dem im Projekt erstellten Demonstrator konnten spektral aufgelöste Fluoreszenzbilder des Augenhintergrundes gewonnen werden.

2 Zielsetzung

Im Rahmen des Verbundprojektes konzentriert sich das Teilprojekt insbesondere auf klinisch-experimentelle Untersuchungen. Ausgehend von Untersuchungen zur Autofluoreszenz der Linse und des Augenhintergrundes von Patienten werden Anforderungen an die Fluoreszenzeigenschaften der Sonden für Amyloid- β und τ -paired helical filaments (τ -PHF) erarbeitet. Weitere Untersuchungen zielen auf die Grundlagen neuer optischer Technologien auf der Basis von MEMS-Scannern. Für die spezifische molekulare Bildgebung zur Erkennung von Amyloid- β , und τ -PHF werden entsprechende Fluoreszenztechniken untersucht, die geeignet sind, die Markerfluoreszenz von der Autofluoreszenz der Gewebe zu trennen. Auf der Grundlage

umfangreicher Erfahrungen mit den Techniken hyperspectral Imaging und Fluorescence Lifetime Imaging wird die Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie Empfehlungen für das Design entsprechender Untersuchungseinheiten zum in-vivo Fluoreszenznachweis am Menschen erarbeiten.

3 Stand von Wissenschaft und Technik

Eine gesicherte Diagnose des Morbus Alzheimer ist derzeit nur post mortem durch histologische Untersuchung des Gehirns möglich. Die aktuelle klinische Diagnostik am lebenden Patienten ist sehr heterogen und stützt sich auf Beobachtungen von Angehörigen (Fremdanamnese), bildgebende Verfahren der Radiologie (CT, MRT und PET), kognitive- und Gedächtnistests sowie den Ausschluss anderer neurodegenerativer Erkrankungen in labordiagnostischen Blut- und Liquoruntersuchungen (CSF). Die bestehenden Diagnoseverfahren wie kognitive Tests, CT und MRT erlauben weder eine Frühdiagnose des Morbus Alzheimer noch eine ausreichende Differentialdiagnose. Neue diagnostische Ansätze, wie die Diagnose mit der PET-Sonde C²-PIB¹, sind zwar in der Lage Morbus Alzheimer auszuschließen. Aber der Wiederholbarkeit der PET-Diagnose sind Grenzen gesetzt. Die optische Bildgebung bietet bei vergleichbarer Sensitivität eine kostengünstigere und wesentlich einfachere Diagnostik. Bedingt durch die geringe Eindringtiefe und die Anwesenheit einer dicken Schädelkalotte ist eine Detektion von β -Amyloid-Plaques im Gehirn nur in Tiermodellen¹ möglich. Das Auge ist wegen der guten Zugänglichkeit für optische Verfahren geeigneter.

4 Verwertung

Finales Ziel ist es, Menschen, die Morbus Alzheimer entwickeln werden, frühzeitig zu erkennen und zu therapieren bevor es zu irreparablen Schäden kommt. Gelingt der Nachweis von Amyloid- β oder τ -PHF mit fluoreszenten Sonden in vivo, so würde dies Möglichkeiten für den nicht- oder minimalinvasiven Nachweis auch anderer molekularer Marker am Auge eröffnen. Die in diesem Projekt entwickelten optischen Techniken sowie die grundlegenden Untersuchungen zu Fluoreszenzeigenschaften könnten hierbei weiter verwendet werden.

5 Arbeiten in den einzelnen Arbeitspaketen und Ergebnisse

5.1 AP 3.1 Grundlagenuntersuchungen zur Autofluoreszenz der Linse und der Retina

Die Emissionsspektren okulärer Gewebe vom Schweineauge sind u.a. mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm gemessen worden. Damit soll aufgezeigt werden, dass die für die A β – Markierung vorgesehenen Verbindungen im Spektralbereich 450 - 510 nm (Bsp. GNTD 4090) anregbar sind. Diese Anregungswellenlänge ist auch im Hinblick auf die spektrale Transmission der Augenlinse günstig. Die Spektren wurden in situ mit dem konfokalen Mikroskop LSM 710 (cLSM; Carl Zeiss Microimaging GmbH) gemessen (Abbildung 1). Die Emissionsmaxima (Anregungswellenlänge 488 nm) lagen bei 558 nm (Cornea), 539 nm und 578 nm (Kammerwasser), 520 nm (Linse), 510 nm (Glaskörper), 587 nm (Retina), 607 nm (RPE) und 558 nm (Sklera).

Das retinale Pigmentepithel (RPE) eines menschlichen Spenderauges (Alter: 47 Jahre) zeigte im Vergleich zum Schweine- RPE eine mehr als zehnmal höhere Fluoreszenzemission (Abbildung 2 A). Ursache dürfte die Akkumulation des Alterspigmentes Lipofuszin sein. Es ist in der Abbildung deutlich als granuläre Struktur zu erkennen. Die schwache Autofluoreszenz des Schweine- RPEs ist deutlich homogener. Da die Schweine in einem Alter von sechs bis neun Monaten geschlachtet werden, hat sich in ihrem RPE noch kaum Lipofuszin gesammelt.

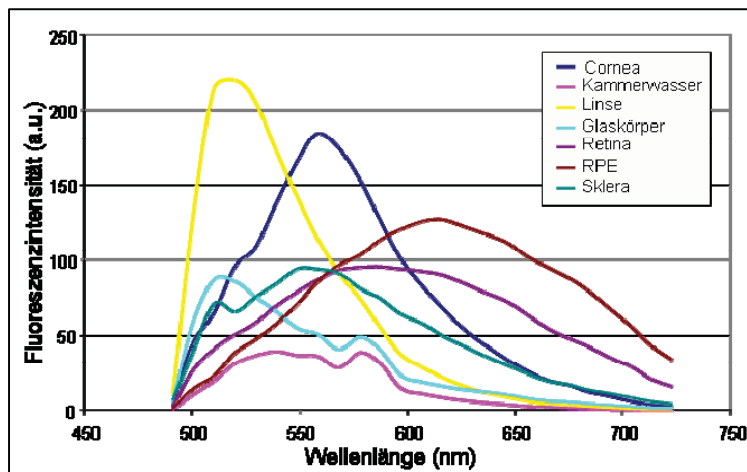


Abbildung 1: Fluoreszenzemissionspektren der okulären Gewebe (Schwein) bei 488 nm Anregung

Spektral zeigt das menschliche RPE eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzemission zu kürzeren Wellenlängen (Abbildung 2B). Der Augenhintergrund weist im gesamten sichtbaren Spektralbereich eine Eigenfluoreszenz auf die oberhalb von 600 nm mit zunehmender Wellenlänge stark abfällt. Die Fluoreszenzemissionsmaxima der Sonden sollten deshalb vorzugsweise oberhalb von 650 nm liegen. Eine Detektion in mehreren Spektralkanälen ist anzustreben um die Farbstofffluoreszenz von der Gewebefluoreszenz durch spektrale Entmischung unterscheiden zu können.

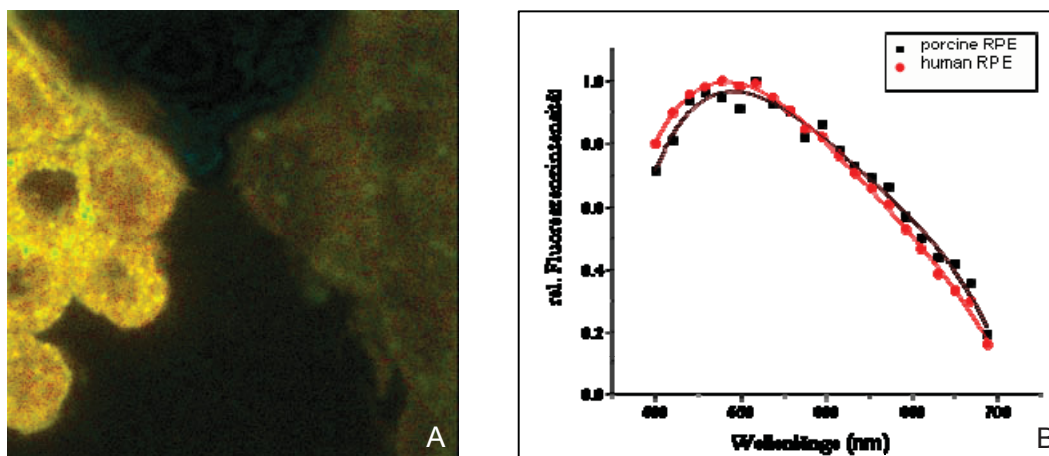


Abbildung 2: (A) Fluoreszenz von menschlichem RPE eines Spenderauges (47 Jahre; Bild A, linker Rand) und Schweine- RPE (Bild A, rechter Rand) sowie deren normierte Fluoreszenzspektren (B) angeregt bei 488nm

5.2 AP 3.2 Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer der Sonden *in vitro*

Von dem Kooperationspartner TU Darmstadt wurden 22 Farbstoff- Sonden zur Verfügung gestellt (Tabelle 1) bzw. von Dyomics GmbH drei Farbstoff- Sonden (DY630, DY730, DY776). Von fast allen Sonden wurden die Absorptions- und Emissionseigenschaften sowohl in reinem Wasser als auch in reinem Methanol bei Raumtemperatur bestimmt.

Des Weiteren erfolgte eine grundsätzliche Prüfung zur spektralen Entmischung der Fluoreszenz der Farbstoff- Sonden und der retinalen Autofluoreszenz. Ein experimenteller Ansatz zur

artifiziellen Deponierung von Farbstoffsonden in humanem Retinagewebe ist bisher noch nicht gelungen, jedoch ließ sich die Fragestellung des Entmischens durch das Zusammenführen von einer Farbstoff- Sonden- Suspension und humanem fixiertem Retinagewebe beantworten. Die o.g. Farbstoff- Sonden lassen sich in einer fluoreszenz- mikroskopischen Aufnahme (Abbildung 3; Anregungswellenlänge 458nm) sehr gut von der retinalen Autofluoreszenz trennen und lokalisieren, auch wenn sie spektral sehr deutlich überlappen. Besonders geeignet erscheinen hierbei die Farbstoff-Sonden mit einer Fluoreszenz-Emission im roten Spektralbereich, wie z.B. DY630.

Tabelle 1: Absorptions- und Emissionsmaxima der Farbstoff- Sonden der TU Darmstadt

| BSc-X | Wasser | | Methanol | | BSc-X | Wasser | | Methanol | |
|-------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Abs _{max} (in nm) | Em _{max} (in nm) | Abs _{max} (in nm) | Em _{max} (in nm) | | Abs _{max} (in nm) | Em _{max} (in nm) | Abs _{max} (in nm) | Em _{max} (in nm) |
| 3814 | 338 | 422 | 388 | 420 | 4352 | 396 | 619 | 435 | 620 |
| 3924 | 390 | 470 | 370 | 440 | 4353 | 425 | 580 | 426 | 565 |
| 4090 | 423 | 560 | 436 | 600 | 4354 | 366 | 523 | 396 | 490 |
| 4096 | 539 | 570 | 542 | 576 | 4355 | 353 | 430/500 | 378 | 453 |
| 4097 | 430 | 568 | 436 | 600 | 4356 | 353 | 492 | 361 | 425 |
| 4187 | 446 | 600 | 450 | 624 | 4358 | 323 | 433 | 360 | 431 |
| 4207 | 339 | 425 | 396 | 420 | 4363 | 392 | 593 | 386 | 550 |
| 4218 | 337 | 492 | --- | --- | 4364 | 328 | 515 | 327 | 470 |
| 4223 | 421 | 615 | 440 | 632 | 4365 | 300 | 440 | 384 | 460 |
| 4307 | 366 | 530 | 363 | 463 | | | | | |

* Löslichkeit zu gering

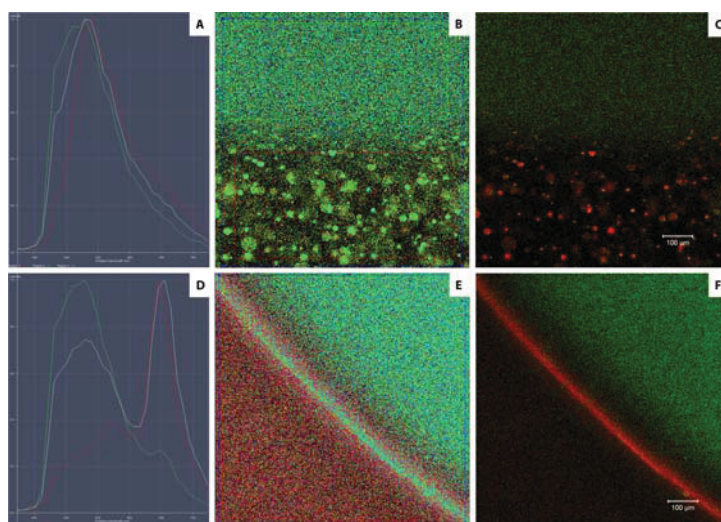


Abbildung 3: Spektrale cLSM- Aufnahmen von humanem fixiertem Retinagewebe und den Farbstoff-Sonden BSc4510 (A-C) und DY630 (D-F). (A,D) Spektren: Retina (grün), Farbstoff-Sonde (rot), Mischung (grau). (B,E) spektrale cLSM- Aufnahme mit suspensierter (B) bzw. gelöster (E) Farbstoff-Sonde. (C,F) Spektral entmischte Retina (grün) und Farbstoff-Sonde (rot). (Anregung bei 458 nm)

5.3 AP 3.3 Klinische Studien

In Kooperation mit der geronto- psychiatrischen Tagesklinik des Universitätsklinikums Jena konnten 18 Patienten mit beginnender Ausprägung der Demenzerkrankung vom Typ Alzheimer (AD) in die Studie eingeschlossen werden. Relevante anamnestische und diagnostische Parameter zum Morbus Alzheimer wurden durch die Gerontopsychiatrie erhoben. Zur Einteilung des Schweregrades wurde u. a. der Mini Mental Status Test (MMST) verwendet.

Labordiagnostische Parameter, wie A β 1-42 oder Tau- Protein, wurden bei einigen AD- Patienten mittels Lumbalpunktion bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen für Zeitraum seit Diagnosestellung, MMST Score, Liquordiagnostik von Beta- Amyloid (1-42), Tau-Protein, Phospho- Tau- Protein (181P).

| | Mean \pm SD | Anzahl | Referenzwerte |
|---|-------------------|--------|----------------|
| Zeitraum seit Diagnosestellung (Monate) | 19.2 \pm 20.2 | 18 | - |
| MMST Score | 23.6 \pm 2.5 | 18 | s. Abbildung 5 |
| Amyloid- β (1-42) in CSF (pg/ml) | 486.2 \pm 190.1 | 6 | > 500 |
| Total-tau in CSF (pg/ml) | 575.4 \pm 334.4 | 8 | < 450 |
| Phospho-tau (181P) in CSF (pg/ml) | 88.3 \pm 38.0 | 6 | < 61 |

MMST, Mini- Mental- Status Test CSF, cerebrospinal fluid

Die AD- Patienten waren 76.9 \pm 6.8 Jahre alt. Für die Untersuchungen wurde jeweils ein Auge als Untersuchungsauge ausgewählt. Bei einigen Patienten war die Bereitschaft und Konzentration über die Dauer und Anzahl der Untersuchungen eingeschränkt. Daraus ergaben sich unterschiedliche Fallzahlen in den Untersuchungen. Weiterhin wurde eine augengesunden Kontrollgruppe (NP; Alter 70.8 \pm 9.0 Jahre) untersucht (Tabelle 3).

Tabelle 3: Charakteristik des Kollektives der Erkrankten und Gesunden.

| | AD | NP |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|
| Fallzahl N | 18 | 13 |
| Alter, mean \pm SD (Jahre) | 76.9 \pm 6.8 | 70.8 \pm 9.0 |
| Geschlecht (F/ M) | 12/6 | 7/6 |
| Linse (phak / pseudophak) | 11/7 | 11/2 |
| Visus, mean \pm SD (log Mar) | 0.18 \pm 0.27 | -0.01 \pm 0.07 |
| IOD, mean \pm SD (in mmHg) | 14.1 \pm 1.9 | 14.2 \pm 1.9 |
| Nebendiagnosen in % (n/ Total) | | |
| Hypertension | 72.2 % (13/ 18) | 69.2% (9/ 13) |
| Diabetes mellitus | 16.7 % (3/ 18) | 7.7 % (1/ 13) |
| AMD (AREDS I - II) | 55.5 % (10/ 18) | 38.5 % (5/ 13) |

AD, Alzheimer disease; SD, Standard deviation; F, female; M, male; IOD, Intraokulardruck; AMD, altersbedingte Makuladegeneration.

5.3.1 AP 3.3.1 Ophthalmologische Untersuchungen

In der Untersuchung des vorderen und hinteren Augenabschnitts durch den Augenarzt konnten keine unnormale Auffälligkeiten festgestellt werden. Im vorderen Augenabschnitt waren die Linsen entweder dem Alter entsprechend im Kern- und Schalenbereich getrübt, oder die getrühte Linse war bereits durch eine künstliche Intraokularlinse (IOL) ersetzt worden. Funduskopisch wurde bei einigen Teilnehmern aus beiden Gruppen eine Frühform der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) diagnostiziert. Bei einer Patientin mit Diabetes mellitus wurde ein diabetisches Makulaödem an einem Auge diagnostiziert. Hier wurde das Partnerauge als Studienauge ausgewählt. Sonst wurde bei keinem Diabetespatient eine diabetische Retinopathie festgestellt. Der Befund des Augenhintergrunds wurde mittels Fundusfotographie dokumentiert. Die Nebendiagnosen, wie Hypertonie und Diabetes mellitus, wurden dokumentiert.

● Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die OCT wurde mit dem Cirrus OCT HD 4.0 (Carl Zeiss Meditec, Jena) durchgeführt. Es wurde die Nervenfaserschichtdicke zwischen der inneren Grenzmembran und dem retinalen Pigmentepithel in dem Bereich der Makula sowie des Sehnervenkopfes (Papille) bestimmt. Die Messparameter der Makula sind Macula thickness (μ m) und Cube Average thickness (μ m). Die peripapilläre retinale Nervenfaserschichtdicke (RNFL) wurde in einem definierten Radius um die Papille bestimmt sowie das Flächenverhältnis der Papillenexkavation zur Papillenfläche (C/R

Ratio). Die Nervenfaserschichtdicke im Bereich der Makula ist bei den AD-Patienten niedriger. Weiterhin ist das C/R Ratio bei den AD- Patienten größer als bei Normalpersonen. Die gemessenen Werte aus beiden Gruppen weisen keine statistisch messbaren Unterschiede auf (Tabelle 4).

• GDx (Scanning Laser Polarimeter)

Mit dem GDx Pro (Carl Zeiss Meditec, Jena) wird ebenfalls die retinale Nervenfaserdicke (RNFL) um die Papille untersucht. Dabei werden vier Segmente um die Papille *superior* (S), *nasal* (N), *inferior* (I) und *temporal* (T) unterschieden. Die ausgegebenen Parameter sind die Mittelwerte aus allen Messpunkten um die Papille sowie die Mittelwerte des oberen (superior) und unteren (inferior) Segmentes. Weiterhin wird die Standardabweichung der TSNIT Mittelwertes angegeben. Die Untersuchung konnte nur bei 12 AD- Patienten in ausreichend guter Qualität durchgeführt werden, da eine exakte Fixierung ohne Blickbewegungen nötig ist. Die gemittelte peripapilläre retinale Nervenfaserdicke (RNFL) sowie die Segmente *superior* und *inferior* der Papille zeigen niedrigere Messwerte in der Gruppe der AD- Patienten (Tabelle 4), aber keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen der Untersuchungen mit OCT und GDx zwischen Alzheimerpatienten (AD) und Normalpersonen (NP) sowie Angabe des p- Wertes.

| | | AD | | NP | | |
|-----|------------------------------------|--------------|------|--------------|------|---------|
| | | mean ± SD | (n) | mean ± SD | (n) | p- Wert |
| OCT | macula thickness (µm) | 253.9 ± 22.7 | (18) | 266.5 ± 18.8 | (13) | 0.186 |
| | average cube macula thickness (µm) | 276.1 ± 16.2 | (18) | 282.7 ± 13.1 | (13) | 0.317 |
| | peripapillary RNFL (µm) | 90.8 ± 7.1 | (11) | 88.4 ± 7.0 | (9) | 0.359 |
| | averaged C/D Ratio (µm) | 0.48 ± 0.19 | (11) | 0.43 ± 0.19 | (9) | 0.589 |
| GDx | peripapillary RNFL (TSNIT; µm) | 48.9 ± 5.9 | (12) | 50.4 ± 6.4 | (10) | 0.582 |
| | segment superior (µm) | 59.2 ± 9.0 | (12) | 61.7 ± 9.3 | (10) | 0.735 |
| | segment inferior (µm) | 60.0 ± 9.6 | (12) | 61.7 ± 10.5 | (10) | 0.639 |

AD, Alzheimer Disease; SD, Standard Deviation; n, Patientenanzahl; OCT, Optical Coherence Tomography; GDx, Scanning Laser Polarimetry; Mann-Whitney- U- Test, *p<0.05;

• Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)

Das verwendete Grundgerät war ein Laserscanner- Ophthalmoskop HRA2 (Heidelberg Engineering, Heidelberg) mit modifizierter Anregungslichtquelle 448 nm und Detektionseinheit mit zwei Spektralkanälen (Kanal1: 490- 560 nm, Kanal2: 560- 700 nm) kombiniert mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) ³. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels SPCImage 3.5 (Becker & Hickl, Berlin). Die zeitabhängige Fluoreszenzintensität wurde 3-exponentiell für jeden Bildpixel angepasst und es ergeben sich die Messparameter Lifetime T_i , Amplitude A_i und relative Anteile Q_i . Abbildung 4 zeigt das Lifetime- Bild mit Häufigkeitsverteilung für T1 im Kanal 2.

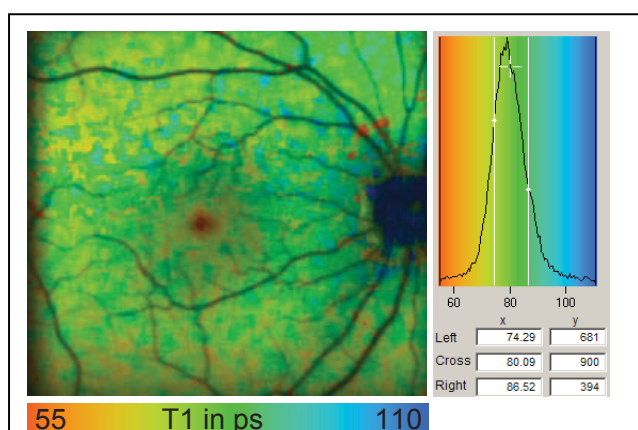


Abbildung 4: Lifetime- Bild T1 (Kanal 2) und Histogramm T1 des Patienten 015.

Für jede Messung wurde eine *Region of Interest* (ROI) mit 101x71 Pixel um die Makula festgelegt, damit immer gleichwertige Messbereiche eingeschlossen werden konnten. In Tabelle 5 sind die Mittelwerte der maximalen Häufigkeitsverteilung aller Messparameter dargestellt. Mittels Mann-Whitney- U- Test wurde geprüft, ob sich die FLIO- Parameter zwischen den beiden Gruppen signifikant unterscheiden. Der relative Anteil Q2 (K1) ist in der AD- Gruppe schwach signifikant höher als in der Gruppe der Normalpersonen ($p=0.035$). Der relative Anteil Q einer Komponente i berechnet sich aus Lifetime T_i und Amplitude A_i . Da die p - Werte für Lifetime T2 ($p=0.052$) und Amplitude A2 ($p=0.063$) ebenfalls nahe 0.05 liegen, könnte sich eine Tendenz zur Unterscheidung der Alzheimer- Patienten von den Normalpersonen in der Komponente 2 andeuten. Im Kanal 2 zeigen sich ebenfalls die deutlichsten Änderungen in der zweiten Komponente. Die Amplitude A2 ($p=0.049$) war in der AD- Gruppe schwach signifikant erhöht.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung der FLIO Parameter (ROI), Fallzahlen und p - Werte.

| | | AD | | NP | | p- Wert |
|-----------|----------------------------------|------------------|------|------------------|------|---------|
| | | mean \pm SD | (n) | mean \pm SD | (n) | |
| FLIO (K1) | Lifetime T1 (ps), K1 | 70.3 \pm 5.9 | (11) | 74.6 \pm 7.9 | (10) | 0.218 |
| | Lifetime T2 (ps), K1 | 425.8 \pm 33.0 | (11) | 467.2 \pm 46.4 | (10) | 0.052 |
| | Lifetime T3 (ps), K1 | 2887 \pm 698 | (11) | 3391 \pm 575 | (10) | 0.063 |
| | Amplitude A1 (%), K1 | 82.1 \pm 2.3 | (11) | 83.1 \pm 2.9 | (10) | 0.280 |
| | Amplitude A2 (%), K1 | 15.0 \pm 1.8 | (11) | 13.4 \pm 2.5 | (10) | 0.063 |
| | Amplitude A3 (%), K1 | 2.8 \pm 1.2 | (11) | 3.3 \pm 1.2 | (10) | 0.315 |
| | relative contribution Q1 (%), K1 | 29.2 \pm 6.8 | (11) | 26.9 \pm 6.5 | (10) | 0.436 |
| | relative contribution Q2 (%), K1 | 32.2 \pm 6.4 | (11) | 26.8 \pm 5.3 | (10) | 0.035* |
| | relative contribution Q3 (%), K1 | 38.4 \pm 12.7 | (11) | 46.3 \pm 10.8 | (10) | 0.089 |
| FLIO (K2) | Lifetime T1 (ps), K2 | 85.1 \pm 7.7 | (11) | 83.1 \pm 7.1 | (10) | 0.605 |
| | Lifetime T2 (ps), K2 | 437.8 \pm 29.3 | (11) | 432.6 \pm 29.1 | (10) | 0.809 |
| | Lifetime T3 (ps), K2 | 2212 \pm 254 | (11) | 2317 \pm 236 | (10) | 0.251 |
| | Amplitude A1 (%), K2 | 70.7 \pm 3.0 | (11) | 73.5 \pm 4.3 | (10) | 0.072 |
| | Amplitude A2 (%), K2 | 25.4 \pm 2.2 | (11) | 22.8 \pm 3.0 | (10) | 0.049* |
| | Amplitude A3 (%), K2 | 4.0 \pm 0.9 | (11) | 3.5 \pm 1.0 | (10) | 0.223 |
| | relative contribution Q1 (%), K2 | 23.5 \pm 3.2 | (11) | 25.5 \pm 4.3 | (10) | 0.314 |
| | relative contribution Q2 (%), K2 | 42.9 \pm 1.9 | (11) | 41.5 \pm 1.8 | (10) | 0.088 |
| | relative contribution Q3 (%), K2 | 33.9 \pm 3.5 | (11) | 33.1 \pm 4.5 | (10) | 0.824 |

AD, Alzheimer Disease; SD, Standard deviation; n, Fallzahl; FLIO, Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy; K, spektraler Kanal; Mann-Whitney- U- Test, * $p<0.05$;

5.3.2 AP 3.3.2 Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Alzheimer-Demenz und den ophthalmologischen Ergebnissen

Um einen Zusammenhang der Demenzausprägung und den ophthalmologischen Untersuchungsparametern (OCT, GDx, FLIO) zu prüfen, wurden die Parameter MMST Score, Beta- Amyloid (1-42) und Tau- Protein herangezogen.

• Mini Mental Status Test (MMST)

Im Mittel erreichten die AD- Patienten einen MMST Score von 23.6 ± 2.5 Punkten (Min 19; Max 28). 72 % dieser Patienten zeigten nach dem MMST Score eine leichte Demenzausprägung (Bereich 18-26 Punkte). Es wurde untersucht, ob die ophthalmologischen Parameter aus OCT, GDx und FLIO mit dem MMST Score korrelieren. Bei einer Normalverteilung der Werte wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Ein signifikant linearer Zusammenhang ergab sich nur in der Untersuchungstechnik FLIO im Kanal 2 für die Amplitude A2 und relativer Anteil Q2 (Abbildung 5A). Es konnte nur bei 11 AD- Patienten eine hinreichende Messqualität der FLIO- Untersuchung erreicht werden. Trotz der geringen Fallzahl zeigte sich eine starke Korrelation von MMST Score und A2 (K2) ($R=-0.618$, $p=0.043$) sowie Q2 im Kanal 2 ($R=-0.757$; $p=0.007$; Tabelle 6).

• Beta- Amyloid

Die Konzentration des im Liquor gemessene Beta- Amyloids ($A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$) zeigte keinen messbaren Zusammenhang mit den ophthalmologischen Daten (OCT, GDx, FLIO).

• Tau- Protein (Gesamt) und Phospho- Tau (181)- Protein

Eine Erhöhung der messbaren Gesamt- Tau- Konzentration im Liquor wird als Indikator des Nervenzelluntergangs beschrieben und im Zusammenhang mit Demenzerkrankungen, u. a. der Alzheimer- Demenz, diskutiert. Des Weiteren ist die Konzentration des Phospho- Tau- Proteins ein spezifischer Parameter in der Diagnostik des Morbus Alzheimer⁴. Aus der untersuchten AD- Gruppe waren von 7 Patienten auswertbare FLIO- Daten und Messwerte des Gesamt- Tau- Proteins sowie von 6 AD- Patienten des Phospho- Tau- Proteins verfügbar. Trotz der geringen Fallzahl zeigte sich eine sehr starke Korrelation von Gesamt- Tau- Protein und Q2 im Kanal 2 ($R=0.906$, $p=0.005$, Abbildung 5B). Das Phospho- Tau- Protein korrelierte ebenfalls mit dem relativen Anteil Q2 im Kanal 2 ($R=0.916$, $p=0.009$, Abbildung 5C).

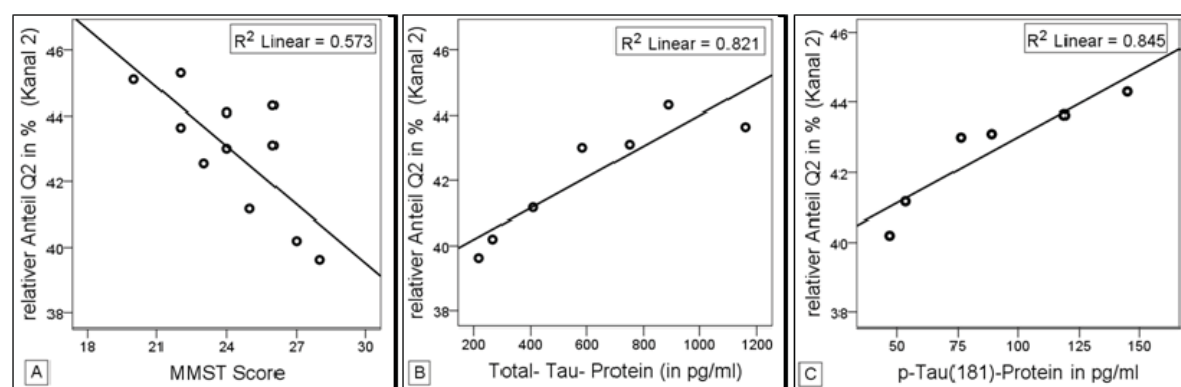


Abbildung 5: Streudiagramm mit Angabe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson für relativen Anteil Q2 (rechts) im Kanal 2 und MMST Score (A), Total-Tau-Protein (B) und Phospho-tau(181) (C).

Tabelle 6: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p- Werte und Fallzahl für MMST, Amyloid- β (1-42), Total- tau- Protein und Phospho- tau(181)- Protein im Zusammenhang mit A2 und Q2 (Kanal 2).

| | | T2 in K2 | A2 in K2 | Q2 in K2 |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| MMST | <i>R</i> | 0.170 | -0.618* | -0.757** |
| | <i>p</i> | 0.618 | 0.043 | 0.007 |
| | <i>n</i> | 11 | 11 | 11 |
| Amyloid- β (1-42) | <i>R</i> | 0.759 | 0.328 | 0.344 |
| | <i>p</i> | 0.137 | 0.590 | 0.571 |
| | <i>n</i> | 5 | 5 | 5 |
| Total-tau | <i>R</i> | -0.104 | 0.694 | 0.906** |
| | <i>p</i> | 0.824 | 0.084 | 0.005 |
| | <i>n</i> | 7 | 7 | 7 |
| Phospho-tau (181P) | <i>R</i> | 0.324 | 0.881* | 0.919** |
| | <i>p</i> | 0.532 | 0.020 | 0.009 |
| | <i>n</i> | 6 | 6 | 6 |

R, Korrelationskoeffizient *n*, Pearson, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; MMST, Mini Mental Status Test; *n*, Fallzahl.

5.3.3 AP 3.3.3 Klinische Untersuchungen mit einem MEMS-scanner basierten Demonstrator zur Aufnahme von spektral aufgelösten Bilder der Fundusautofluoreszenz

Aufnahmen wurden von 18 gesunden Probanden (mittleres Alter 39.9 ± 9.7 Jahre, Anregung bei 488nm) bzw. 19 Probanden (mittleres Alter 41.4 ± 10.1 Jahre, Anregung bei 514nm) gewonnen. Ein Beispiel zeigt Abb. 6. Deutlich sind die typischen anatomische Strukturen der Netzhaut wie Papille, Makula und Blutgefäße zu erkennen.

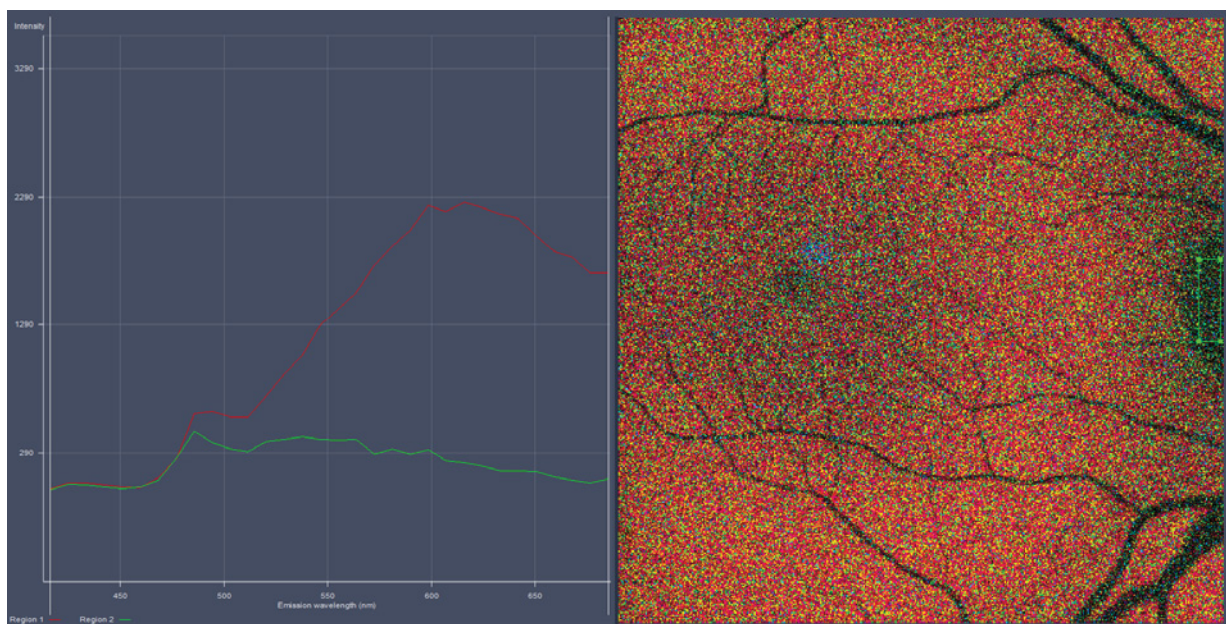


Abbildung 6: farbodierte Darstellung der spektral aufgelösten Autofluoreszenz (Anregung 488nm) des Fundus eines gesunden Probanden (rechts) und zwei repräsentative Spektren (links) von der Retina (rot) und der Papille (grün).

Die Fluoreszenzspektren zeigen die bekannten Verläufe mit Maxima bei 530 nm (Papille) und 600 nm (Netzhaut).

5.4 AP 3.4 Der Lipoproteinrezeptor LRP1 als möglicher Biomarker am Auge zur Diagnostik der Alzheimer-Demenz

Ziel des Arbeitspaketes war es, aussagekräftige Biomarker am Auge zur Diagnostik der Alzheimer-Demenz (AD) zu identifizieren. Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Lipoproteinrezeptor LRP1 deuten auf eine mögliche pathologische Relevanz bei der Genese von Morbus Alzheimer hin. Ziel der Untersuchungen war der Nachweis und die Quantifizierung des löslichen Anteils des LRP1-Proteins (sLRP1) in der Tränenflüssigkeit und inwiefern sich dieser als sensitiver und spezifischer Biomarker in der Diagnostik erweist. Bei gesunden Probanden (ohne familiären AD Hintergrund) und AD- Patienten mit leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Demenz (nach Mini-Mental-Status-Test) wurde mithilfe von Schirmer-Teststreifen Tränenflüssigkeit aus dem unteren Bindehautsack entnommen. Zur Normierung der Proben wurde die Gesamtproteinkonzentration nach der Bradford- Methode bestimmt. Der Nachweis und die Quantifizierung des löslichen Anteils des LRP1-Rezeptors erfolgten durch elektrophoretischer Trennung (SDS-PAGE, 3-8% Tris-Acetate) und anschließender Western-Blot- Analyse (α -LRP1). Die Detektion der spezifischen Protein-Antikörper-Bindung erfolgte durch Chemilumineszenzreaktion. Zur Ermittlung der Bandenintensität (densitometrische Auswertung) wurden die digitalisierten Röntgenfilme mit der Software *analySIS® 3.5* ausgewertet. Es wurde der mittlere Grauwert bestimmt und auf den internen Standard (Größenmarker MagicMark™ XP 220 kDa Bande, Invitrogen) bezogen, um Intensitätsschwankungen der einzelnen Western- Blot- Analysen zu korrigieren.

Der lösliche Anteil des LRP1-Rezeptors (sLRP1) konnte in der Tränenflüssigkeit sowohl bei den Alzheimer-Patienten (AD) als auch bei den Kontrollgruppen (NP>50 Jahre, NP<50 Jahre) nachgewiesen werden. Die Intensitäten der Western- Blot- Signale (Abbildung A) wurden als Maß der relativen Quantifizierung des sLRP1 herangezogen.

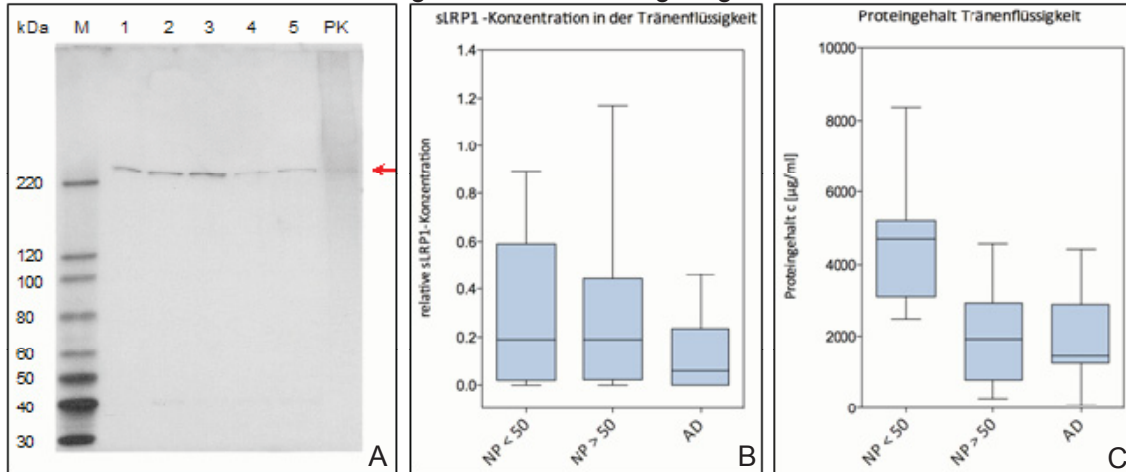


Abbildung 7: (A) Western- Blot- Nachweis von sLRP1- Protein (roter Pfeil) in der Tränenflüssigkeit. (1-5) Aliquots von Tränenflüssigkeit getester Probanden normiert auf Gesamtproteinmenge; (PK) Positivkontrolle HepG2-Zelllysate; (M) MagicMark™ XP (lifetechnologies); (B) Boxplot über relative sLRP1- Konzentration und (C) Gesamtproteingehalt in der Tränenflüssigkeit. Alzheimer- Patienten (AD), Kontrollgruppe jünger als 50 Jahre (NP<50) und Kontrollgruppe älter als 50 Jahre (NP>50).

Mithilfe des Mann- Whitney- U- Tests wurde untersucht, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den AD-Patienten bestand. Zwischen den AD-Patienten und den jungen Gesunden sowie der gesunden, alterskorrelierten Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede an sLRP1-Protein in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. Für den Parameter Proteingehalt gibt es signifikante Unterschiede zwischen der jüngeren, gesunden Kontrollgruppe und den Alzheimerpatienten ($p < 0.001$) sowie

zwischen der jüngeren, gesunden und der älteren, gesunden Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Dagegen gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der gesunden, alterskorrelierten Kontrollgruppe und der AD- Gruppe.

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen sLRP1-Konzentration und dem Gesamtproteingehalt (c [$\mu\text{g/ml}$]) in der Tränenflüssigkeit sowie p- Werte aus den Vergleichen zwischen den Gruppen.

| | relative sLRP1- Konzentration | Proteingehalt ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| mean \pm SD | | |
| AD (n = 14) | 0.131 \pm 0.162 | 1838 \pm 1260 |
| NP < 50 J (n = 17) | 0.302 \pm 0.291 | 4424 \pm 1532 |
| NP > 50 J (n = 14) | 0.289 \pm 0.320 | 1880 \pm 1290 |
| Vergleich zwischen den Gruppen | | |
| AD versus NP < 50 | p = 0.092 | p < 0.001 |
| AD versus NP > 50 | p = 0.177 | p = 0.982 |
| NP < 50 versus NP > 50 | p = 0.702 | p < 0.001 |

SD, Standardabweichung; N, Fallzahl; nicht- parametrischer Mann- Whitney- U- Test, $p < 0.05$.

Die relative Konzentration des sLRP1 sowie die Proteinkonzentration der Tränenflüssigkeit korrelieren nicht mit Alzheimer- spezifischen Parametern, wie MMST Score, Konzentration von $A\beta_{1-42}$ oder Tau- Protein der Lumbalpunktion. Es scheint eher eine Altersabhängigkeit der sLRP1- Konzentration und des Proteingehalts im Tränenfilm zu geben, als eine AD- typische Korrelation. Damit wäre das LRP1- Protein keine geeigneter Biomarker für eine zuverlässige AD- Diagnostik am Auge.

6 Ausblick

Der gefunden Zusammenhang von Komponenten der Fluoreszenzlebensdauer mit dem MMST-Score und der Konzentration von τ -Protein ist weiter zu untersuchen. Die im Projekt entwickelten MEMS-Scanner Technik besitzt das Potential für eine Entwicklung neuartiger Geräte für die Fundusbildgebung.

Literatur

- 1 M. Hintersteiner, A. Enz, P. Frey, A. L. Jatón, W. Kinzy, R. Kneuer, U. Neumann, M. Rudin, M. Staufenberg, M. Stoeckli, K. H. Wiederhold, and H. U. Gremlich, 'In Vivo Detection of Amyloid-Beta Deposits by near-Infrared Imaging Using an Oxazine-Derivative Probe', *Nat Biotechnol*, 23 (2005), 577-83.
- 2 W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Aisen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, and B. Langstrom, 'Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B', *Ann Neurol*, 55 (2004), 306-19.
- 3 D. Schweitzer, 'Metabolic Mapping', in *Medical Retina: Focus on Retinal Imaging*, ed. by F. Holz (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2010).
- 4 Volker Welge, Oliver Fiege, Piotr Lewczuk, Brit Mollenhauer, Hermann Esselmann, Hans-Wolfgang Klafki, Stefanie Wolf, Claudia Trenkwalder, Markus Otto, Johannes Kornhuber, Jens Wiltfang, and Mirko Bibl, 'Combined Csf Tau, P-Tau181 and Amyloid-B 38/40/42 for Diagnosing Alzheimer's Disease', *Journal of Neural Transmission*, 116 (2009), 203-12.

7 Anhang

DOG Kongress 2011, Berlin:

Der Lipoproteinrezeptor LRP1 als möglicher biologischer Marker am Auge zur Diagnostik der Alzheimer-Demenz (Poster PS11-108)

Schmidtke K.-U.¹, Schweitzer D.¹, Werner U.¹, Hammer M.¹

¹Universitätsklinikum Jena, Klinik für Augenheilkunde, AG Experimentelle Ophthalmologie, Jena

Two-Photon excited fluorescence microscopy of ocular fundus for the interpretation of fundus autofluorescence analysis in vivo (Poster PS36-330)

Peters S.¹, Deutsch L.¹, Hammer M.¹, Schweitzer D.¹, Dawczynski J.²

¹Universitätsklinikum Jena, Klinik für Augenheilkunde, AG Experimentelle Ophthalmologie, Jena

² Universitätsklinikum Leipzig AöR, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Leipzig

Publikation:

Peters, S., Hammer M., Schweitzer D. (2011). Two-photon excited fluorescence microscopy application for ex vivo investigation of ocular fundus samples. European Conference on Biomedical Optics (ECBO) Munich, Germany. P. So and E. Beaulieu, Optical Society of America. **8086:** 808605.

Publikation in Vorbereitung

Determination of changes in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO) in dependence on severity of Alzheimer's disease

Jentsch S.¹, Schmidtke K.-U.¹, Hammer M.¹, Dawczynski J.², Bär K.-J., Schweitzer D.¹

¹Universitätsklinikum Jena, Klinik für Augenheilkunde, AG Experimentelle Ophthalmologie, Jena

² Universitätsklinikum Leipzig AöR, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Leipzig

³ Universitätsklinikum Jena, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Jena

→ *Einreichung bei Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS) geplant*

medways e.V.

Geschäftsführer

Dipl.-Ing. Volker Wiechmann

Keßlerstraße 21 b

07745 Jena

Tel.: +49 - 3641 – 87 610 40

Fax: +49 - 3641 – 87 610 50

E-Mail: info@medways.eu

Homepage: www.medways.eu